云 南 植 物 研 究 2007, 29 (5): 537～542
Acta Botanica Yunnanica

东俄洛橐吾遗传变异与分化的 ISSR 分析*

王金凤[1,2], Chiaki kuroda[3], 龚 洵[1**]
(1 中国科学院昆明植物研究所, 云南 昆明 650204; 2 中国科学院研究生院, 北京 100049;
3 *Department of Chemistry, Rikkyo University*, Tokyo 171-8501, Japan)

摘要: 应用 ISSR 标记对东俄洛橐吾 (*Ligularia tongolensis*) 的遗传多样性进行了研究。从 100 个引物中筛选出 8 个用于正式扩增。在所研究的 8 个居群共 150 个个体中检测到 148 个多态位点。在居群水平上, 多态位点百分率 (*PPB*) 为 50.45%, Nei's 基因多样性指数 (*H*) 和 Shannon 信息指数 (*I*) 分别为 0.1595 和 0.2440。在物种水平上, 多态位点百分率 (*PPB*) 为 88.10%, Nei's 基因多样性指数 (*H*) 和 Shannon 信息指数 (*I*) 分别为 0.2811 和 0.4279。居群间的遗传分化系数 (G_{st}) 达 0.4355。研究结果表明东俄洛橐吾的遗传多样性水平很高, 居群间遗传分化较大。这与其多样化的生态环境是有必然联系的。因适应其多样化的生态环境而形成了遗传多样性; 且因其生态环境的不连续性阻碍了居群间的基因交流而产生了遗传分化, 即东俄洛橐吾高水平的遗传多样性和遗传分化是适应其分布区多样化生态环境的结果。

关键词: 东俄洛橐吾; 居群; 遗传多样性; 遗传分化
中图分类号: Q 16 **文献标识码**: A **文章编号**: 0253-2700 (2007) 05-537-06

Assessment of Genetic Variation and Differentiation of *Ligularia tongolensis* (Compositae) Detected by ISSRs

WANG Jin-Feng[1,2], Chiaki kuroda[3], GONG Xun[1 **]
(1 *Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650204, China;
2 *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China;
3 *Department of Chemistry, Rikkyo University*, Tokyo 171-8501, Japan)

Abstract: The genetic diversity of *Ligularia tongolensis* (Franch.) Hand.-Mazz. was analyzed by inter-simple sequence repeat markers (ISSR). Eight informative and reliable primers were chosen from 100 pre-screened primers, of which, 148 ISSR loci were polymorphic. Genetic diversity was high with $PPB = 50.45\%$, $H = 0.1595$ and $I = 0.2440$ at population level; $PPB = 88.10\%$, $H = 0.2811$ and $I = 0.4279$ at species level. The $G_{st} = 0.4355$ indicated a high degree of genetic differentiation occurred among *L. tongolensis* populations. The main factor responsible for the high level genetic diversity and genetic differentiation among populations ascribed to diversified habitats diversification. Gene flow was inhibited by its habitats discontinuity which finally caused the genetic differentiation.

Key words: *Ligularia tongolensis* (Franch.) Hand.-Mazz.; Population; Genetic diversity; Genetic differentiation

东俄洛橐吾 (*Ligularia tongolensis* (Franch.) Hand.-Mazz.) 是菊科 (Compositae) 千里光族 (Tribe Senecioeae) 橐吾属伞房组羽脉系植物。为多年生草本, 根肉质, 茎直立, 伞房状花序, 稀头状花序单生, 瘦果圆柱形, 产西藏东南部, 云南西北部, 四川西南部至西北部, 生于海拔 2 140～4 000 m 的山谷湿地、林缘、林下、灌丛及高山草甸 (刘尚武, 1989)。橐吾属包括 6 组、

* 基金项目: 国家自然科学基金 (30670210)
** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: gongxun@mail.kib.ac.cn
收稿日期: 2006-12-30, 2007-04-09 接受发表
作者简介: 王金凤, 女, 在读硕士研究生, 主要从事群体遗传学研究。

11 系、129 种，所有种类均分布在亚洲，仅 2 种扩散至欧洲。在东亚地区有 119 种，占该属总数的 96%。高度集中在横断山区的有 4 组，6 系，67 种，其中 61 种为特有种，占该属总组数的 66%，总系数的 54.5%，总种数的 52%，这个事实表明了横断山区是该属的多样化和分布中心。本属的现代分布中心在横断山区，而初始起源中心则在中国中部（包括四川东部），因此是一个起源中心与分布中心不在同一地区的属（刘尚武等，1994）。所以，该属被认为是研究横断山区植物物种起源与多样化的好类群。

前人在居群水平上对橐吾属植物以化学成分和 DNA 序列研究橐吾属植物的遗传多样性，以期探讨其物种多样化的形成机制以及青藏高原抬升的生物效应，研究结果表明，在 19 个东俄洛橐吾（*Ligularia tongolensis*）居群中存在 5 个 *atp*B-*rbc*L 单倍体型（Haplotype），在 10 个黄帚橐吾（*L. pleurocaulis*）中存在 2 个 ITS 单倍体型和 5 个 *atp*B-*rbc*L 单倍体型（Hanai 等，2005；Nagano 等，2006；Tori 等，2006）。作者认为东俄洛橐吾正处于激烈的分化阶段。鉴于此，本文采用分子标记 ISSR 对东俄洛橐吾的遗传变异与遗传分化进行了研究，旨在揭示东俄洛橐吾的遗传多样性水平和遗传结构，探讨其遗传变异在居群水平上的分布式样，并结合东俄洛橐吾生态环境的多样性来探讨其种系的分化格局。

1 材料和方法

1.1 实验材料背景资料

在东俄洛橐吾的分布区内，按居群进行取样，共采集 8 个居群，每个居群的详细资料见表 1 和图 1。每个个体采取 2～3 片无病斑的嫩叶，用硅胶干燥，4℃保存至提取 DNA。

1.2 DNA 的提取与 PCR 扩增

取 0.1 g 左右硅胶干燥的叶片，采用改良 CTAB 法提取植物总 DNA（Doyle，1991）。

PCR 反应在 GeneAMP PCR 仪上进行。其 20 μL 的反应体系为：灭菌水 13.3 μL，formamide 0.3 μL，10×PCR buffer 2.0 μL，25 mmol/L 的 Mg^{2+} 1.6 μL，2.5 mmol/L 的 dNTP（大连宝生物）1.21 μL，10 μmol/L 的引物（上海博亚）0.4 μL，5 u/μL 的 Taq 酶（大连宝生物）0.2 μL，20 ng/μL 的 DNA 模板 1 μL。扩增程序：94℃ 7 min，1 个循环；然后 94℃ 45 s，53 或 54℃ 1 min，72℃ 2 min，共 35 个循环；最后 72℃ 7 min，1 个循环。电泳条件：PCR 扩增产物以 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳，0.5%EB 染色，0.5×TBE 缓冲液和 4 V/cm 的电压电泳分离。

1.3 数据分析

将 ISSR 电泳胶图记录后进行人工读带，以 100 bp DNA ladder 为分子量标准，同一引物扩增的电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性，属于同一位点的产物。按扩增阳性计为 1，扩增阴性计为 0 的格式构成 ISSR 表型数据矩阵，采用 POPGENE1.32 软件（Yeh 等，1997）计算出东俄橐吾各居群的 Nei′s 基因多样性指数（*H*）、Shannon 信息指数（*I*）、多态位点百分率（*PPB*）、基因分化系数（G_{st}）、基因流（$N_m = (1 - G_{st})/4G_{st}$）、居群内基因多样度（*Hs*）和总的基因多样度（*Ht*）。

表 1 用于本研究的 8 个居群的样品来源

Table 1 Information of 8 *Ligularia tongolensis* populations for ISSR analysis

居群代号 Code	居群分布地 Population	采样数 Sample	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔 Elevation (m)
DBSH	云南香格里拉县 大宝山 Dabaoshan	17	27°27′N	99°65′E	3200
SHKSH	云南香格里拉县 石卡山 Shikashan	20	27°50′N	99°41′E	3500
GZ	云南香格里拉县 格咱 Gezan	16	28°26′N	99°55′E	3500
XHSH	云南香格里拉县 小恒山 Xiaohengshan	20	28°49′N	99°78′E	3600
NX	云南香格里拉县 尼西 Nixi	17	28°03′N	99°25′E	3520
WMSH	云南省禄劝县 乌蒙山 Wumengshan	20	24°63′N	103°12′E	3200
XXSH	云南省香格里拉县 小雪山 Xiaoxueshan	20	28°80′N	99°59′E	3700
LCH	四川省木里 林场 Linchang	20	27°76′N	101°33′E	3700

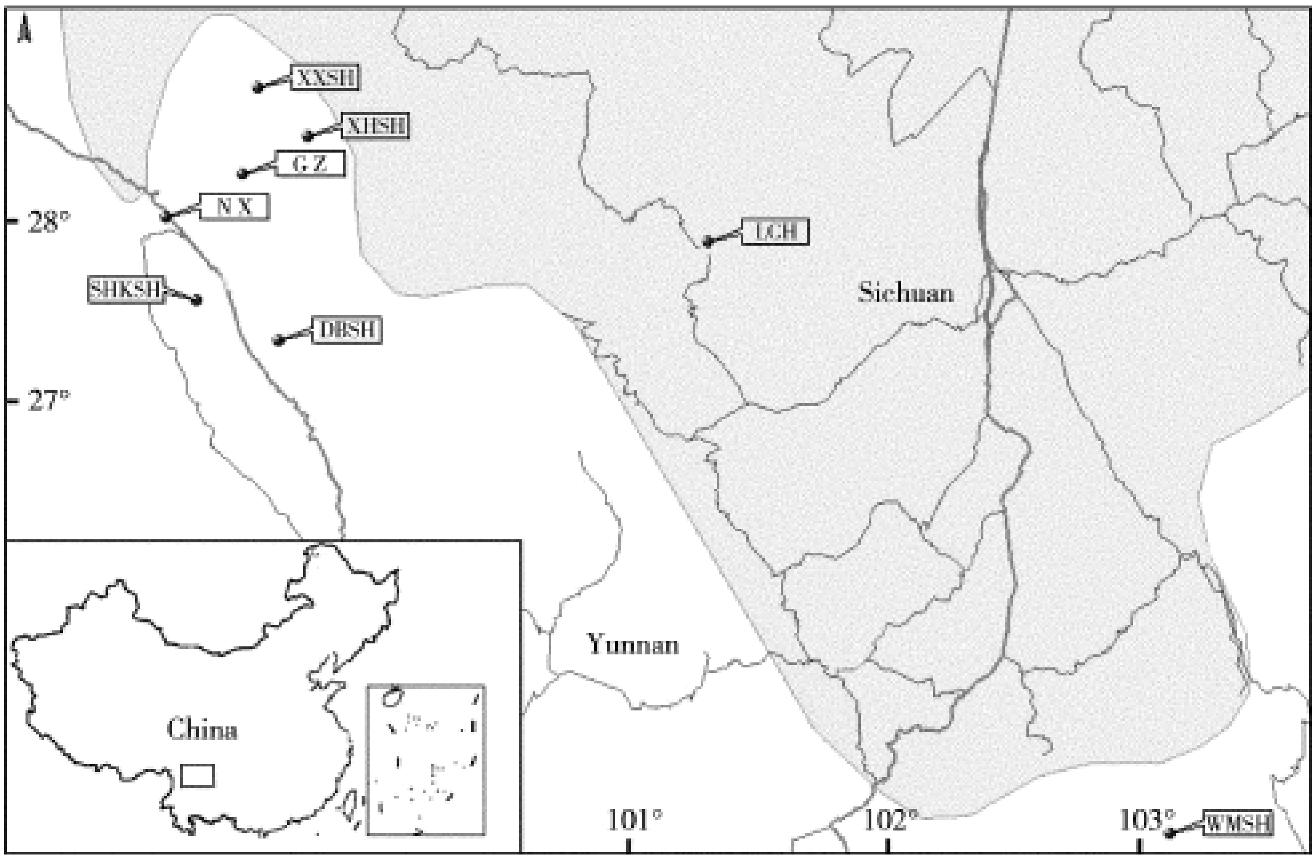


图 1 东俄洛橐吾的取样分布图 (居群代号同表 1)

Fig. 1 Map showing locations of the 8 sampled *L. tongolensis* populations. Population codes are the same as those in Table 1

2 实验结果

2.1 引物筛选结果

从哥伦比亚大学设计 (上海博亚生物技术有限公司合成) 的 100 条引物中筛选出 8 个条带清晰、稳定性和重复性好且相对较多条带的引物用于全部样品的 PCR 扩增 (表 2)。

部分引物的扩增结果如图 2 和图 3。

2.2 遗传多样性和遗传分化分析

表 2 本研究选用的 8 个引物和扩增条件及检测到的位点数

Table 2 Attributes of ISSR primers used to generate ISSR markers for 150 individuals of *L. tongolensis* sampled from 8 populations

Primer	Sequence (5′ to 3′)	Annealing temperature (℃)	No. of scorable bands	No. of poly-morphic bands	Polymorphism (%)
UBC809	$(AG)_8$ G	54	20	17	85.00
UBC818	$(CA)_8$ G	54	22	19	86.36
UBC823	$(TC)_8$ C	53	23	22	95.65
UBC834	$(AG)_8$ YT	53	15	11	73.33
UBC845	$(CT)_8$ RG	53	21	19	90.48
UBC856	$(AC)_8$ YA	53	20	18	90.00
UBC857	$(AC)_8$ YG	53	23	19	82.61
UBC873	$(GACA)_4$	53	24	23	95.83
Total			168	148	88.10

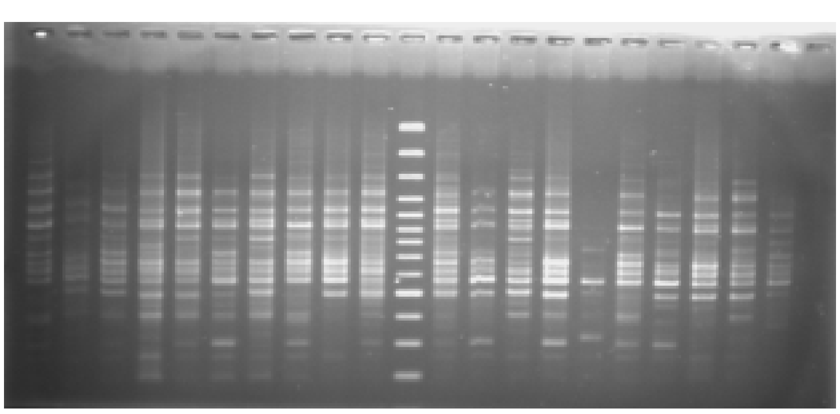


图 2 引物 857 对 SHKSH 居群部分样品的扩增样式

Fig. 2 Part of electrophoresis of PCR products of Population SHKSH via primer 857

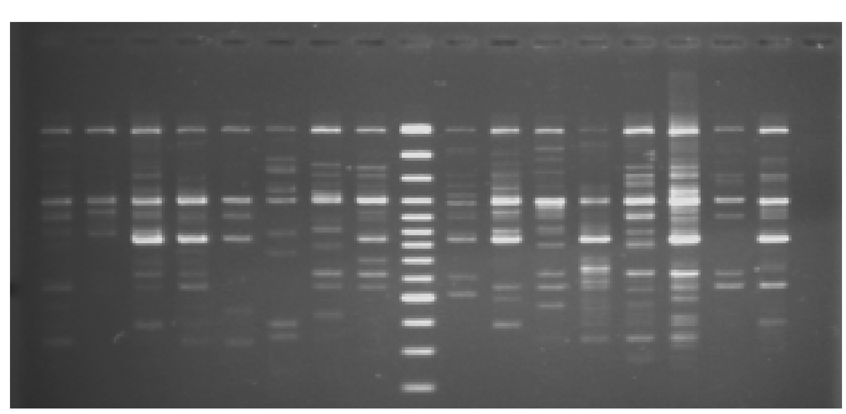


图 3 引物 873 对 GZ 居群部分样品的扩增样式

Fig. 3 Part of electrophoresis of PCR products of Population GZ via primer 873

对东俄洛橐吾8个居群共150个个体的群体遗传分析表明东俄洛橐吾的遗传多样性水平很高。在检测到的所有清晰且重复性好的168个有效位点中有148个多态位点。在物种水平上，多态位点百分率（*PPB*）为88.10%，Nei's基因多样性指数（*H*）和Shannon信息指数（*I*）分别为0.2811和0.4279，基因多样度（*Hs*）和总基因多样度（*Ht*）分别为0.1595和0.2825。从各个居群来看，石卡山居群（SHKSH，*PPB* = 39.88%）多态位点百分率最低，而大宝山居群（DBSH，*PPB* = 62.5%）的最高，格咱居群和小雪山居群的处于中等水平，结果见表3和表4。

居群间的Nei's基因分化系数（G_{st}）是0.4355，表明在物种水平上，有56.45%的遗传变异存在于居群内，而43.55%的遗传变异存在于居群间，居群之间表现出较高水平的遗传分化。居群间的基因流（$N_m = 0.5(1 - G_{st})/G_{st}$）为0.6482。

2.3 聚类分析

从聚类图看，大宝山居群（DBSH）与乌蒙山居群（WMSH）聚为一支，其他6个居群聚为另一支。从地理上看，乌蒙山居群与其他居群的地理距离很远；但聚类分析结果显示，乌蒙山居群与云南西北部的大宝山居群聚在一起而与其他6个居群分开，即其遗传距离与地理距离没有显著的相关性；而其余6个居群的聚类分析也得到同样的结果，如格咱居群（GZ）与石卡山居群（SHKSH）聚到一起，但地理上这两个居群被尼西居群（NX）所隔开。

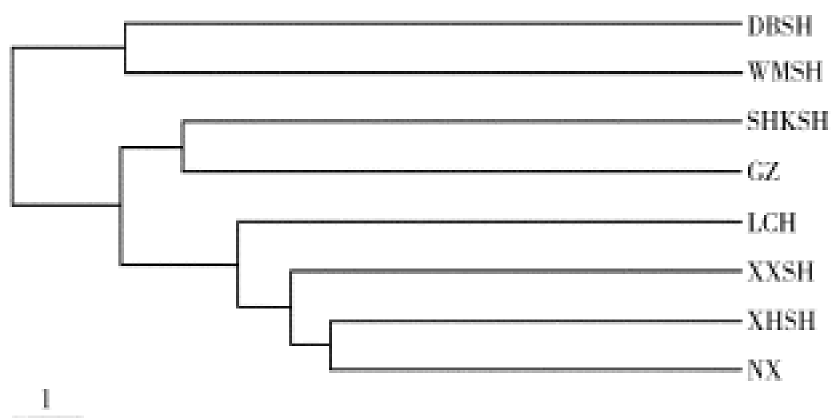


图4 东俄洛橐吾的UPGMA聚类图（居群代号同表1）

Fig.4 UPGMA dendrogram of *L. tongolensis*. Population codes are the same as those in Table 1

表3 东俄洛橐吾自然居群内的遗传多样性

Table 3 Genetic variation in natural populations of *Ligularia tongolensis*

居群 Population	观察等位基因数 *Na*	有效等位基因数 *Ne*	Nei's基因多样性 *H*	Shannon信息指数 *I*	多态位点百分率 *PPB*%
DBSH	1.6250±0.4856	1.3378±0.3458	0.2049±0.1883	0.3119±0.2712	62.50
SHKSH	1.3988±0.4911	1.2040±0.3170	0.1239±0.1764	0.1899±0.2578	39.88
GZ	1.5119±0.5014	1.2507±0.3175	0.1556±0.1801	0.2401±0.2638	51.19
XHSH	1.5357±0.5002	1.2959±0.3442	0.1786±0.1907	0.2710±0.2765	53.57
NX	1.5000±0.5015	1.2539±0.3301	0.1549±0.1842	0.2374±0.2680	50.00
WMSH	1.4167±0.4945	1.2245±0.3316	0.1343±0.1842	0.2038±0.2675	41.67
XXSH	1.5119±0.5014	1.2561±0.3313	0.1566±0.1832	0.2407±0.2664	51.19
LCH	1.5357±0.5002	1.2704±0.3267	0.1670±0.1820	0.2572±0.2659	53.57
居群水平 Mean	1.5045±0.4970	1.2617±0.3305	0.1595±0.1836	0.2440±0.2671	50.45
物种水平	1.8810±0.3248	1.4681±0.3364	0.2811±0.1688	0.4279±0.2274	88.10

表4 东俄洛橐吾的遗传一致度（对角线上方）和遗传距离（对角线下方）

Table 4 Nei's (1972) original measures of genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

Code	DBSH	SHKSH	GZ	XHSH	NX	WMSH	XXSH	LCH
DBSH	****	0.8331	0.8141	0.8254	0.8160	0.8362	0.8136	0.8393
SHKSH	0.1826	****	0.8504	0.8536	0.8213	0.7966	0.8728	0.8239
GZ	0.2056	0.1620	****	0.8537	0.7988	0.7629	0.8589	0.8019
XHSH	0.1919	0.1583	0.1581	****	0.8879	0.8161	0.8836	0.8511
NX	0.2033	0.1968	0.2247	0.1189	****	0.7804	0.8716	0.8654
WMSH	0.1789	0.2274	0.2706	0.2033	0.2480	****	0.8003	0.8206
XXSH	0.2063	0.1361	0.1521	0.1238	0.1375	0.2228	****	0.8757
LCH	0.1752	0.1937	0.2208	0.1613	0.1446	0.1977	0.1327	****

3　讨论

3.1　东俄洛橐吾的遗传多样性和遗传结构

Hanai 等（2005）对东俄洛橐吾的化学成分和叶绿体 DNA 的非编码区间 *atp*B～*rbc*L 的核苷酸序列进行了研究，在居群水平上，东俄洛橐吾的化学成分和 *atp*B～*rbc*L 的核苷酸序列均存在一定的差异，有 5 种 *atp*B～*rbc*L 单倍体型。本研究中东俄洛橐吾 8 个自然居群的 PPB = 88.10%，Nei′s 基因多样性指数 H = 0.2811，Shannon 信息指数 I = 0.4279，基因多样度（Hs）和总基因多样度（Ht）分别为 0.1595 和 0.2825，G_{st} = 0.4355，说明 43.55%的变异存在于种群间，群体内的变异占了总变异的 56.45%。表明东俄洛橐吾的遗传多样性水平很高，种群内有较丰富的遗传变异，与 Hanai 等的研究结果一致。Nybom（2004）总结了 158 份 RAPD、27 份 AFLP、13 份 ISSR 的研究结果所得出的 G_{st} 平均值分别是 0.27、0.21 和 0.34。与 Nybom 所得出的平均值相比，东俄洛橐吾 8 个自然居群呈现出了居群间遗传分化大的特点。

影响物种遗传多样性的因素很多，如分布范围、生活型、繁育系统、种子散布机制等等。一个物种的遗传多样性是该物种长期进化的产物，是各种因素综合作用的结果，并且不同因素的相互作用往往会产生不同的结果。而东俄洛橐吾之所以会表现如此高的遗传多样性水平与其多样化的生态环境可能有直接联系。它不但可以生长在山谷湿地、林缘、林下，而且也可以生长在向阳的山坡、灌丛及高山草甸，干旱及湿润的地方均有分布。与此相对应，东俄洛橐吾的植株形态变异很大：生长在湿润地带的个体极高；而生长在干旱地带的个体则很矮小。东俄洛橐吾是多年生草本，根肉质，由于长时间适应多种多样的生活环境导致东俄洛橐吾的表型变异及高的遗传多样性。

植物居群之间的遗传分化是其长期进化历史(包括分布范围的改变、生境的片断化和居群的隔离等)、基因突变、遗传漂变、交配系统和基因流以及自然选择等因素的综合反映（Schaal 等，1998）。葛颂等（1994）认为，在居群水平上，繁育系统是影响遗传分化的重要因素。Wright（1931）认为群体间的基因流值若小于 1，有限的基因流是促使群体发生遗传分化的主要原因。对于东俄洛橐吾，我们认为导致其自然居群间显著的遗传分化的主要原因是有限的基因流（0.6482）和生境选择压力。种子植物基因流的实现主要是通过其种子散布和花粉的传播。由弱飞行能力的动物授粉和靠种子迁移的植物居群间的遗传分化显著（Avise，1994）。野外观察发现，东俄洛橐吾主要由熊蜂授粉。此种熊蜂的飞行能力较弱，迁移距离有限，影响了基因流的扩散。在高山环境中，传粉昆虫的种类和数量都比较少，活动频率也比较低（Murray，1987；Keams and Inouye，1994；Bingham and Orthner，1998），从而增加了这种依赖昆虫传粉植物生殖保障的风险，特别是对于那些依赖专一性昆虫传粉的植物来说更是如此（Koner，1999）。Liu 等（2006）认为适应辐射是橐吾属植物物种形成与多样化的主要机制，东俄洛橐吾物种形成以后经受多样化生境的选择压力，不同生境下的居群各自分化。

3.2　结合东俄洛橐吾生态环境的多样性来探讨其种系的分化格局

物种的遗传多样性和遗传分化与其种系起源、演化密切相关。橐吾属的现代分布中心在横断山区，而起源中心则在中国中部（包括四川东部），因此是一个起源中心与分布中心不在同一地区的属。本属的起源时间至少是第三纪古新世之前或白垩纪中期，且其形成与扩散与第三纪森林植物区系有密切的关系（刘尚武，1994）。Liu 等（2006）认为适应辐射是橐吾属植物物种形成与多样化的主要机制，在青藏高原抬升过程中，形成彼此隔离的多样化的生境，橐吾属植物适应横断山区多样化的生境而形成了其物种多样性和遗传多样性。对于任何一个物种来说，其遗传多样性越丰富，对环境变化的适应能力就越强，就越容易扩展其分布范围和开拓新的环境(葛颂和洪德元，1994)。我们认为东俄洛橐吾（*L. tongolensis*）较高的遗传多样性可能是其多样化的生长环境造成的。Hanai 等（2005）研究了 19 个东俄洛橐吾（*L. tongolensis*）居群和 13 个舟叶橐吾（*L. cymbulifera*）居群的 *atp*B～*rbc*L 序列和化学成分。前者的 19 个居群中存在 5 个 *atp*B～*rbc*L 单倍体型（Haplotype），与之相比，同属的舟叶橐吾（*L. cymbulifera*）其化学成分和 *atp*B～*rbc*L 的核苷酸序列没有差异。由此 Hanai 等认

为这可能是由于舟叶橐吾（*L. cymbulifera*）生态幅较窄，生境单一，通常只能生长在湿润的草甸地带，而东俄洛橐吾（*L. tongolensis*）的生境多样，对生长环境的适应而造成东俄洛橐吾高水平的遗传多样性，且仍处于分化中。这与我们的结论是一致的。聚类分析结果显示，乌蒙山居群与云南西北部的大宝山居群聚在一起而与其他六个居群分开，而八个居群中只有乌蒙山一个居群分布在云南中部。从地理上看，乌蒙山居群与其他居群的地理距离很远，即其遗传距离与地理距离没有显著的相关性。

在青藏高原的抬升过程中，形成了多样化的生态环境，东俄洛橐吾适应其多样化的生态环境而形成了较高的遗传多样性；因其生态环境的不连续性，阻碍了居群间的基因交流而产生了遗传分化，即东俄洛橐吾的高水平的遗传多样性和遗传分化是适应其分布区多样化生态环境的结果。

致谢 感谢本实验室的杨杨、杨淑达及潘跃芝在数据分析方面所给予的帮助。

〔参 考 文 献〕

葛颂, **陈家宽**, **杨继**, 1994. **植物进化生学** [M]. **武汉**: **武汉大学出版社**, 153—208

刘尚武, 1989. **中国植物志第77卷（第2分册）**[M]. **北京**: **科学出版社**

Avise JC, 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution [M]. New York: Chapman & Hall

Bingham RA, Orthner AR, 1998. Efficient pollination of alpine plants [J]. *Nature*, **391**: 238—239

Doyle J, 1991. DNA protocols for plants-CTAB total DNA isolation [A]. In: Hewitt GM, Johonston A, eds. Molecular techniques in taxonomy [M]. Berlin: Springer, 283—293

Ge S (**葛颂**), Hong DY (**洪德元**), 1994. Genetic diversity and its detection [A]. In: Qian YQ (**钱迎倩**), Ma KP (**马克平**) eds. Principles and Methodologies of Biodiversity Studies (**生物多样性研究的原理与方法**) [M]. Beijing: China Science and Technology Press, 123—140

Hanai R, Gong X, Tori M *et al*. 2005. Chemical and genetic study of *Ligularia tongolensis*, *Ligularia cymbulifera*, and *Ligularia atroviolacea* in the Hengduan Mountains of China [J]. *Bull Chem Soc Jpn*, Vol.78

Keams CA, Inouye DW, 1994. Fly pollination of *L. humlewisii* (Linaceae) [J]. *Amer J Bot*, **81**: 1091—1095

Koner C, 1999. Alpine Plant Life-Functional Plant Ecology of High Mountain Ecosystems [M]. New York, Berlin: Springer-Vertag, 259—290

Liu JQ, Wang YJ, Wang AL *et al*. 2006. Radiation and diversification within the *Ligularia-Cremanthodium-Parasenecio* complex (Asteraceae) triggered by uplift of the Qinghai-Tibetan Plateau [J]. *Mol Phylogenet Evol*, **38**: 31—49

Liu SW (**刘尚武**), Deng DS (**邓德山**), Liu JQ (**刘健全**), 1994. The origin, evolution and distribution of *Ligularia* Cass (Compositae) [J]. *Acta Phytotax Sin* (**植物分类学报**), **32** (6): 515

Murray DF, 1987. Breeding system in the vascular flora of arctic North America [A]. In: Urbanska KM ed. Diferentiation Patterns in Higher P1ants [M]. London: Academic Press, 239—262

Nagano H, Iwazaki Y, Gong X *et al*. 2006. Chemical and Genetic Differentiation of Ligularia pleurocaulis in Northwestern Yunnan and Southwestern Sichuan Provinces of China [J]. *Bull Chem Soc Jpn*, **79** (2): 300—304

Nei M, 1972. Genetic distance between populations [J]. *Amer Natural*, **106**: 283—292

Nybom H, 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plant [J]. *Mol Ecol*, **13**: 1143—1155

Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM *et al*. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects [J]. *Mol Ecol*, **7**: 465—474

Tori M, Honda K, Nakamizo H *et al*. 2006. Chemical constituents of *Ligularia virgaurea* and its diversity in southwestern Sichuan of China [J]. *Tetrahedron*, **62**: 4988—4995

Wright S, 1931. Evolution in Mendelian population [J]. *Genetics*, **16**: 97—159

Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ *et al*. 1997. POPGENE, the User-friendly Shareware for population Genetic Analysis [Z]. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Canada.